



Vaccines against coccidiosis in poultry - contain oocysts of coccidiostat-resistant Eimeria strains
Patent Assignee: PETERSE M T M

Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
NL 8802399	A	19900417	NL 882399	A	19880929	199019	B

Priority Applications (Number Kind Date): NL 882399 A (19880929)

Abstract:

NL 8802399 A

Compsns. (including feeds and drinking water) for prevention of harmful effects of coccidiosis in poultry contain sporulating oocysts of one or more Eimeria strains that are totally or largely resistant to coccidiostatic agents.

The oocysts are derived from resistant strains of E. acervulina and/or E. maxina. The dosage is 10-5000 (esp. 50-500) oocysts/chicken. In the case of broiler fowl, the compsns. are administered at least 3 weeks before slaughter. In the case of laying hens, the compsns. are administered before the hens are 12 weeksold.

ADVANTAGE - The compsns. overcome the disadvantages of conventional vaccines (see Avian Pathology, 1986, 5, 271 and 629) by specifically controlling resistant strains and allowing other strains to be controlled with coccidiostatic agents, which do not interfere with the vaccination process.

Dwg.0/0

Derwent World Patents Index

© 2001 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 8258369

Octrooiraad



⑫ A Terinzagelegging ⑪ 8802399

Nederland

⑲ NL

- ⑤4 Preparaat, geschikt voor gebruik inzake de preventie van de bij coccidiosis optredende schade bij pluimvee, voedsel resp. drinkwater, dat een dergelijk type preparaat bevat, werkwijze voor het voorkomen van de bij coccidiosis optredende schade bij pluimvee door toepassing van een dergelijk preparaat bij pluimvee, dat een voeder resp. drinkwater krijgt toegediend waarin continu een of meer anticoccidiosismiddelen aanwezig is alsmede het behandelde pluimvee.
- ⑤1 Int:Cl¹: A61K39/012.
- ⑦1 Aanvrager: Marcus Theodorus Martinus Peterse te Hagestein.
- ⑦4 Gem.: Ir. L.C. de Bruijn c.s.
Nederlandsch Octrooibureau
Scheveningsweg 82
2517 KZ 's-Gravenhage.

THE BRITISH LIBRARY
- 4 MAY 1990
SCIENCE REFERENCE AND
INFORMATION SERVICE

- ②1 Aanvraag Nr. 8802399.
- ②2 Ingediend 29 september 1988.
- ③2 --
- ③3 --
- ③1 --
- ⑥2 --

- ④3 Ter inzage gelegd 17 april 1990.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Preparaat, geschikt voor gebruik inzake de preventie van de bij coccidiosis optredende schade bij pluimvee, voedsel resp. drinkwater, dat een dergelijk type preparaat bevat, werkwijze voor het voorkomen van de bij coccidiosis optredende schade bij pluimvee door toepassing van een dergelijk preparaat bij pluimvee, dat een voeder resp. drinkwater krijgt toegediend waarin continu een of meer anticoccidiosismiddelen aanwezig is alsmede het behandelde pluimvee.

10 De uitvinding heeft betrekking op een preparaat, dat geschikt is voor toepassing inzake de preventie van de schade, welke coccidiosis bij pluimvee veroorzaakt.

Coccidiosis is een bij pluimvee voorkomende ziekte, welke door verschillende typen Eimeriae, t.w. de Eimeria (E.) acervulina, E.maxima, E.tenella, E. necatrix, E.brunetti, E.hagani, E.mitis, E.mivati en E.praecox wordt veroorzaakt. Ieder van de genoemde typen heeft specifieke antigene eigenschappen. Binnen één type worden geen sub-typen onderscheiden, die zich kenmerken door verschillende antigene eigenschappen. Buiten het lichaam van het pluimvee wordt de ziektekiem als een eivormig lichaampje, dat oöcyst wordt genoemd, aangetroffen. De grootte, kleur en vorm is afhankelijk van de soort Eimeriae (zie o.a. Reid W.M. et al., Coccidiosis, "Diseases of Poultry", Iowa State University Press, 1984, blz.691-717). De oöcyst wordt door het kuiken of de kip opgenomen. In het maagdarmkanaal van het dier verliest de oöcyst zijn wand en kunnen 20 een achttal sporozoieten, die in de oöcyst aanwezig zijn, deze verlaten. De sporozoieten dringen de epitheelcellen van de gastheer binnen en vermenvuldigen zich daar ongeslachtelijk via enkele stadia schizonten en vervolgens geslachtelijk via gametocyten, die uiteindelijk leiden tot de vorming van nieuwe oöcysten, welke met de ontlasting worden uitgescheiden. De nieuwe generatie oöcysten is direkt na de uitscheiding nog niet 30 infectieus en dient eerst te sporuleren. Bij dit sporulatieproces, dat ongeveer twee dagen in beslag neemt, worden in de oöcyst vier sporocysten gevormd, die ieder twee sporozoieten bevatten. Na de sporulatie zijn de oöcysten infectieus en worden rijpe of gesporuleerde oöcysten genoemd. Omdat deze gesporuleerde oöcysten een nauwelijks aan te tasten wand bezitten, kunnen deze, afhankelijk van de omgeving, dagen tot jaren 35 buiten het lichaam van de kip in leven en infectieus blijven.

Bij een besmetting van pluimvee met gesporuleerde oöcysten, komt

het vermenigvuldigingsproces van de Eimeriae op gang. Dit proces wordt coccidiosis genoemd en kan zich op verschillende wijzen manifesteren. Hierbij worden de (a) acute klinische coccidiosis (b) de chronische klinische coccidiosis en (c) de sub-klinische coccidiosis onderscheiden. Al 5 deze vormen van besmetting gaan met schade gepaard. Naast de boven vermelde drie vormen kan eveneens een zeer geringe infectie optreden, welke niet met schade gepaard gaat, wel de immuniteit bevordert en ook wel coccidiasis wordt genoemd (Malcolm Reid W, et al., Coccidiosis, "Diseases of poultry", Iowa State University Press, 1984, blz. 691-717). 10 Welke vorm coccidiosis tot stand komt hangt vooral af van het aantal oöcysten, waarmee de dieren geïnfecteerd worden, de virulentie van het betreffende soort en de eventueel reeds aanwezige immuniteit.

Klinische coccidiosis wordt gekenmerkt door duidelijk zichtbare ziekteverschijnselen zoals algemeen ziek zijn, diarree, bloed in de ont- 15 lasting en sterfte. Subklinische coccidiosis gaat gepaard met een te hoge voederkonversie en een te geringe groei. In de bovenvermelde literatuurplaats zijn van iedere soort Eimeriae eveneens de specifieke kenmerken uitvoerig beschreven.

Onder de soorten pluimvee worden naast hoenders eveneens kalkoenen 20 en parelhoenders genoemd, aangezien ook bij deze dieren coccidiosis voorkomt. Echter spelen bij deze dieren andere soorten Eimeriae een rol.

De uitvinding heeft in het bijzonder betrekking op het voorkomen van schade ten gevolge van coccidiosis bij slachtkuikens alsook bij op- 25 fokkuikens, welke bestemd zijn als toekomstige legkippen. Meer in het bijzonder komt bij slachtkuikens zowel de klinische als de subklinische coccidiosis voor. Hierbij is vastgesteld, dat subklinische coccidiosis, welke veroorzaakt is door E.maxima en E.acervulina de kuikens de grootste schade berokkent wanneer de dieren twee à drie weken voor het slachten geïnfecteerd worden. Wanneer de infectie vijf à zes weken voor het 30 slachten optreedt blijft de schade minimaal. Bij opfokkuikens, welke bestemd zijn als toekomstige legdieren voor consumptie- of broedeieren, komt coccidiosis op dezelfde wijze voor als bij slachtkuikens. Men wordt echter vaker geconfronteerd met klinische vormen. Dit vindt o.a. zijn 35 oorzaak in het minder gebruik van anti-coccidiosismiddelen in de voeders. Bij legpluimvee, dat in de opfok nog geen immuniteit tegen de betrokken Eimeriae- soorten hebben opgedaan worden meestal meerdere typen coccidiosis aangetroffen.

Voor het bestrijden van de coccidiosis bij pluimvee heeft de farmaceutische industrie vanaf de vijftiger jaren middelen ontwikkeld, die 40 aan voeders van kuikens kunnen worden toegevoegd en die de ontwikke-

lingsstadia van Eimeriae kunnen doden, d.w.z. coccidiocide middelen, of de voortgang in de ontwikkeling kunnen afremmen, d.w.z. coccidiostatische middelen. Tesa-men worden deze middelen "anti-coccidiosismiddelen" genoemd. Voorbeelden van bekende anti-coccidiosismiddelen zijn:

- 5 amprolium
- amprolium+ethopabate
- pyrimethamine
- zoalen
- aklomide
- 10 sulfaquinoxaline
- nitrofurazone
- nicarbazin
- glycamide
- sulfachlorpyrazin
- 15 monensin
- lacalocid
- salinomycin
- maduramycin
- narasin
- 20 buquinolate
- decoquinate
- clopidol
- robenidine
- clopidol+methylbenzoate
- 25 halofuginone
- aprinocid en
- toltrazuril

Ten behoeve van pluimvee, dat lijdende aan coccidiosis is, zijn

30 coccidiosismiddelen en wel chemotherapeutica en antibiotica ontwikkeld. Deze middelen zijn in staat ontwikkelingsstadia van Eimeriae te doden. Veel van deze middelen behoren tot de sulfonamiden. Daarnaast zijn azurilpreparaten eveneens zeer werkzaam als geneesmiddel. Bepaalde geneesmiddelen kunnen een of meerdere malen worden toegediend om coccidiosis te voorkomen. Ze hebben dan de functie van een anti-coccidiosismiddel. In het kader van de uitvinding worden deze geneesmiddelen eveneens als "anti-coccidiosismiddelen" aangeduid.

Gebleken is echter, dat enkele typen Eimeriae geheel of grotendeels resistent tegen de bekende anti-coccidiosismiddelen en coccidiosismiddelen zijn. Daar bepaalde Eimeriastammen bedrijfsgebonden op-

40

5 treden kan het voorkomen, dat op een bepaald bedrijf een enkel Eimeria-type resistent is tegen een of meerdere coccidiosismiddelen of geneesmiddelen, welke middelen daarnaast zeer werkzaam zijn tegen andere Eimeriae-soorten. Echter neemt het verschijnsel van resistentie toe en is er de oorzaak van, dat bij slachtkuikens subklinische coccidiosis in het algemeen en klinische coccidiosis regelmatig optreedt.

10 Zoals bekend kan pluimvee een immuniteit opbouwen tegen coccidiosis (Long P.L. et al., Immunisation of young broiler chickens with low level infections of Eimeria tenella, E.acervulina or E.maxima, Avian Pathology, 1986, 15, blz. 271-278). Deze immuniteit is soortspecifiek. Als kuikens tweemaal aan een geringe infectie van E.maxima-, E.brunetti- of E.acervulina-oöcysten worden blootgesteld ontstaat een desbetreffende immuniteit. Ten aanzien van E.tenella en E.necatrix zijn meer dan twee infecties nodig om een immuniteit te bewerkstelligen. Gebleken is, dat 15 een dagelijkse besmetting met 1 tot 20 oöcysten E.acervulina, E.maxima of E.tenella gedurende twintig dagen een solide immuniteit opwekt. Als kuikens of kippen met een gering aantal oöcysten geïnfecteerd worden ontstaan herinfecties, die tot een immuniteit leiden. Deze natuurlijke infectie gaat met enige schade gepaard. Er is in feite sprake van sub- 20 klinische coccidiosis. Als het dier de infectie vroeg oploopt zal het, zoals is gebleken, de schade kunnen compenseren.

Uit Dorsman W., De enting van kuikens tegen coccidiosis, Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 1956, 17, blz. 783-790 is het bekend 25 dieren opzettelijk met oöcysten te besmetten om het proces van immuniteitsvorming op gang te brengen. Daarbij zijn er vaccins van mengsels van oöcysten van al de bij de kip optredende Eimeriae-soorten ontwikkeld. Deze oöcysten zijn dan afkomstig van normale veldstammen of veldstammen, die toevallig minder virulent zijn bevonden. Het resultaat van deze vaccins valt vaak tegen omdat

- 30 - hetzij de verschillende soorten allen tegelijk aanslaan en een te zware, niet herstelbare infectie opwekken;
- hetzij bepaalde soorten in het geheel niet aanslaan, waardoor de dieren gevoelig blijven;
- hetzij bepaalde soorten slechts bij een zeer klein aantal dieren aanslaan, die het hok massaal besmetten, waardoor ernstige klinische 35 coccidiosis bij de overige dieren kan ontstaan.

Uit Shirley M.W., Millard B.J., Studies on the immunogenety of seven attenuated lines of Eimeria given as a mixture to chickens, Avian Pathology, 1986, 15, blz. 629-638 zijn vaccins bekend, die berusten op 40 het gebruik van "precocious strains" of in embryonen afgezwakte Eimeria-

stammen. Het resultaat van het gebruik van deze vaccins is onder praktijkomstandigheden echter nog niet bekend.

Resumerend kan worden gesteld, dat coccidiosis in toenemende mate schade bij pluimvee veroorzaakt. Hierbij speelt de subklinische coccidiosis bij slachtkuikens de belangrijkste rol. Als oorzaak moet
5 worden genoemd, dat de resistentie van Eimeriae ten opzichte van de anticoccidiosismiddelen en -geneesmiddelen toeneemt. Daarbij wordt het probleem aangaande deze toenemende resistentie niet opgelost door de huidige in de handel zijnde vaccins.

10 De uitvinding is nu gelegen in het oplossen van het bovenbeschreven probleem inzake de toenemende resistentie tegen anti-coccidiosis-middelen en -geneesmiddelen met behulp van gesporuleerde oöcysten van telkens een of enkele soorten Eimeriae, die resistent zijn tegen een of meer der bekende anti-coccidiosismiddelen. De uitvinding heeft derhalve betrek-
15 king op een preparaat, geschikt voor gebruik inzake de preventie van de bij coccidiosis optredende schade bij pluimvee, welke gekenmerkt wordt door een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van Eimeriae- en/of Iso-sporeae-soorten, welke geheel of grotendeels resistent zijn geworden voor anti-coccidiosis-middelen. Meer in het bijzonder heeft de uitvin-
20 ding betrekking op preparaten, welke gekenmerkt worden door een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van E.acervulina en/of E.maxima, meer in het bijzonder van een combinatie van beide Eimeriae-soorten. Bovenbedoelde preparaten volgens de uitvinding kunnen naast de oöcysten in kwestie een of meer hulpmiddelen zoals op veterinair gebied aanvaardbare viscosi-
25 teitsverhogende stoffen, conserveermiddelen en kleurstoffen bevatten.

Voorts heeft de uitvinding betrekking op een of meer bekende anti-coccidiosis-middelen bevattend voedsel resp. drinkwater voor pluimvee, dat gekenmerkt wordt door een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van Eimeriae-soorten welke geheel of grotendeels resistent zijn geworden
30 voor de anti-coccidiosis-middelen. Zoals vermeld worden bij voorkeur oöcysten van E.acervulina en/of E.maxima toegepast.

Daarnaast heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het voorkomen van subklinische en klinische coccidiosis bij slachtpluimvee, dat via het voeder continu een of meer anti-coccidiosismiddelen krijgt
35 verstrekt en waarbij men ten minste drie weken vóór de slacht het pluimvee met een preparaat volgens de uitvinding behandelt resp. het voedsel c.q. drinkwater met het preparaat volgens de uitvinding aan het pluimvee toedient. Wanneer het in plaats van slachtkuikens opfoklegkuikens betreft worden aan deze laatstgenoemde kuikens, welke tot een leeftijd
40 van ca 14 weken in de groeifase vertoeven en op een leeftijd van 16 à 18

weken gebruiksgeres dienen te zijn, overeenkomstig de uitvinding, vòòr de leeftijd van twaalf weken het preparaat volgens de uitvinding resp. het voeder c.q. drinkwater met het preparaat volgens de uitvinding toegediend. Bij het toedienen van de oöcysten van de betreffende geheel of grotendeels resistent geworden Eimeriae-typen kunnen 10-5000 bij voorkeur 50-500 exemplaren per kuiken worden toegediend.

Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op het al dan niet geslachte pluimvee, dat overeenkomstig de werkwijze volgens de uitvinding is behandeld.

10 Het voordeel van de uitvinding is in het bijzonder gelegen in het feit, dat door het planmatig toedienen van oöcysten van een of een beperkt aantal typen Eimeriae, welke geheel of grotendeels resistent zijn geworden tegen de tot nu toe bekende anti-coccidiosis-middelen de nadelen van de tot nu toe in gebruik zijnde vaccins worden voorkomen, 15 terwijl tegelijkertijd de coccidiosis, welke veroorzaakt zou worden door de overige typen Eimeriae voorkomen wordt door de algemeen bekende en in de handel verkrijgbare anti-coccidiosis-middelen in het voeder/drinkwater.

Het winnen van de oöcysten van de Eimeria typen, welke in het kader 20 van de uitvinding worden toegepast, is algemeen uit de literatuur bekend. Een overzicht van enkele winmethoden wordt bijvoorbeeld in Ryley J.F. et al., Parasitology (1976), 73, "Methods in Coccidiosis Research: Separation of Oocysts from Faeces", blz. 311-326 gegeven. In dit verband wordt naar voren gebracht, dat in het licht van de uitvinding de win- 25 methode van de oöcysten als zodanig niet kritisch is.

De uitvinding wordt onderstaand toegelicht aan de hand van een drietal experimenten:

A) In het eerste experiment is bij in kooien op strooisel gehouden 30 kuikens nagegaan of de door Aanvraagster geïsoleerde E.acervulinastam, aangeduid als de stam EA-LA en de door Aanvraagster geïsoleerde E.maximastam, aangeduid als de stam EM-WB, geschikt zijn om planmatig te infekteren. Bij dit onderzoek is vastgesteld dat:

1) E.acervulina-oöcysten van de stam EA-LA en E.maxima-oöcysten van de 35 stam EM-WB in staat zijn bij slachtkuikens op strooisel na een infectie op de leeftijd van één week direkt subklinische coccidiosis op te wekken, hetgeen tot uitdrukking komt in een massale oöcysten-uitscheiding;

2) de ontwikkeling van subklinische coccidiosis niet beïnvloed wordt 40 door de gebruikte infectiedosis;

- 3) het gehele proces van ontwikkeling tot subklinische coccidiosis en de genezing hiervan zonder schade verloopt; en
- 4) de infectieproef niet gestoord wordt door de aanwezigheid van monensin-natrium in het voeder; dit wijst er op dat de beide Eimeriae-stammen geheel of vrijwel geheel resistent zijn voor het gebruikte anti-coccidiosismiddel.

B) In het tweede experiment, eveneens met kuikens in kooien op strooisel uitgevoerd, is nagegaan of de bovengenoemde Eimeriae-stammen tezamen in staat zijn een bescherming op te wekken. Bij dit onderzoek is vastgesteld dat:

- 1) de E.acervulina-stam en de E.maxima-stam, toegepast als combinatie met elkaar, in staat zijn slachtkuikens op een leeftijd van één week met succes te infekteren;
- 2) de beide stammen in staat blijken te zijn slachtkuikens na een infectie op de leeftijd van één week te beschermen tegen herinfecties op een leeftijd van vier weken; en
- 3) de toegepaste hoeveelheid oöcysten, 50 van ieder type, voldoende blijkt te zijn om het proces te bewerkstelligen.

C) In het derde experiment is nagegaan of de in kooien opgedane bevindingen evenzeer opgaan onder praktijkomstandigheden. In dit experiment is bij onder normale praktijkomstandigheden gehouden slachtkuikens aangetoond dat:

- 1) het planmatig infekteren van slachtkuikens van een week oud met een suspensie van de bovengenoemde E.acervulina-, E.maxima-oöcysten en hulpstoffen, toegediend middels het drinkwater, direkt aanslaat;
 - 2) het op jeugdige leeftijd geïnfecteerde koppel (= groep dieren) hiervan geen enkel nadeel ondervindt;
 - 3) de planmatige infectie op jonge leeftijd een goede bescherming opbouwt; en
 - 4) de aanwezigheid van het anti-coccidiosismiddel monensin-natrium in het voeder de opbouw van de bescherming niet in de weg staat.
- Al deze experimenten worden onderstaand uitvoerig beschreven.

VOORBEELD I

Het infecteren van slachtkuikens met Eimeria acervulina of Eimeria maxima in kooien met strooisel (Experiment 1)

5

Inleiding

Bij pluimvee ontstaat een immuniteit tegen coccidiosis als de dieren met oöcysten van een bepaalde Eimeria-soort en in voldoende mate geïnfecteerd zijn geweest. Een gering aantal oöcysten is al in staat dit fenomeen op te wekken omdat na een vermenigvuldigingsproces in de darm oöcysten met de ontlasting uitgescheiden worden en de infectie opnieuw plaats vindt. In feite kan men dan van coccidiosis spreken die zich als regel subklinisch zal gedragen.

De Eimeria (E.) acervulina-stam EA-LA en de E.maxima-stam EM-WB zijn geïsoleerd uit strooisels van slachtkuikens van Nederlandse bedrijven. Beide stammen zijn weinig virulent. Ze zijn resistent tegen het ionofore anti-coccidiosismiddel monensinnatrium. Of beide stammen goede immuniteitvormers zijn wordt nader onderzocht. Hierbij wordt een proef opgezet, waarbij slachtkuikens die nooit met coccidiosis in aanraking zijn geweest E.acervulina-oöcysten van de stam EA-LA of E.maxima-oöcys-
ten van de stam EM-WB krijgen toegediend, teneinde na te gaan of:

- 1) de beide stammen zich voldoende snel vermenigvuldigen bij kuikens op strooisel gehouden;
- 2) de toegediende hoeveelheid oöcysten dit proces op gang brengt;
- 25 3) dit proces na het toedienen van verschillende hoeveelheden oöcysten met schade gepaard gaat; en
- 4) dit proces ongestoord verloopt als 100 ppm monensin-natrium in de voeders aanwezig is.

30 Proefopzet, monsternamen en methoden.

Proefopzet

Er zijn twee experimenten opgezet. In experiment (1a) werden kuikens besmet met E.acervulina-oöcysten (stam EA-LA), in experiment
35 (1b) met E.maxima-oöcysten (stam EM-WB). De proefomstandigheden waren bij beide proeven gelijk.

Per experiment werden vier groepen slachtkuikens (ras Arbor Acres) van telkens 30 henkuikens in kooien op strooisel geplaatst. Iedere kooi was omhuld door een zak van kunststofmateriaal waarin gefiltreerde lucht
40 werd geblazen. Het bodemoppervlak per kooi bedroeg ca. 1 m². De kuikens

werden op fijne houtkrullen gehouden. In iedere kooi was een verwarmingslamp aanwezig. Via een klep aan een korte kant kon men in de kooi werkzaamheden verrichten.

De kuikens werden tot op het einde van het experiment gevoerd met
5 een commercieel slachtkuikenvoer waaraan 100 ppm monensin-natrium was toegevoegd.

Proefopzet experiment 1a

Op een leeftijd van zeven dagen werden de dieren uit de proefgroepen geïnfecteerd per os met 1 ml van een gesporuleerde oöcystensuspensie
10 in water.

In groep 1 met 50 oöcysten E.acervulina.

In groep 2 met 500 oöcysten E.acervulina.

In groep 3 met 5000 oöcysten E.acervulina.

15 In groep 4 werden de dieren niet geïnfecteerd.

Proefopzet experiment 1b

20 De wijze en tijdstip van besmetten was gelijk aan experiment 1a. De infectiedosis was als volgt:

In groep 1 met 50 oöcysten E.maxima.

In groep 2 met 500 oöcysten E.maxima.

In groep 3 met 5000 oöcysten E.maxima.

25 In groep 4 werden de dieren niet geïnfecteerd.

Monsternamen en onderzoeksmethoden

Iedere week werd het aantal oöcysten in het strooisel geteld volgens de methode Long. (Long P.L. et al., Sampling broilerhouse litter
30 for coccidial oocysts, British Poultry Science 1975, 16, blz. 583-592).

Op een leeftijd van 21 en 35 dagen werden telkens 5 kuikens geselecteerd en de laesies beoordeeld volgens de methode van Johnson en Reid (Johnson J. et al., Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Experimental
35 Parasitology, 1970, 28, blz. 30-36) in het voorste, middelste en het achterste deel van de dunne darm. Afhankelijk van de ernst van de laesies werden deze gewaardeerd met de punten 0, 1, 2 of 3 per beoordelingsplaats. Tevens had een microscopisch onderzoek van het voorste, middelste en achterste deel van de darm plaats, teneinde een eventuele
40 aanwezigheid van oöcysten vast te stellen. Deze kuikens werden niet

gewogen en in de gemiddelde gewichten betrokken.

Wekelijks werden de overige kuikens gewogen. Per week werd met de "Student-T"-toets nagegaan of er verschillen tussen de proefgroepen en de kontrolegroep aanwezig waren. Van een significant verschil werd 5 gesproken als P gelijk of kleiner dan 0,01 is.

Dagelijks werden de dieren geobserveerd en na afloop van de proef op een leeftijd van 42 dagen had een bloedonderzoek plaats ten aanzien van Mg (Mycoplasma gallisepticum), NCD (New Castle Disease), IB (Infectious bronchitis) en IBD (Infectious bursal disease).

10

Resultaten

In Tabel 1A wordt het aantal E.acervulina-oöcysten in het strooisel, uitgedrukt in 2-log, van experiment 1a weergegeven.

In Tabel 1B worden dezelfde gegevens verstrekt van experiment 1b 15 voor het aantal E.maxima-oöcysten.

TABEL 1A

Het aantal E.acervulina-oöcysten (2-log) per gram strooisel per week per 20 proefgroep. De infectie heeft plaatsgevonden op een leeftijd van één week.

<u>Leeftijd</u>	<u>Aantal oöcysten</u>			
	<u>Groep 1</u>	<u>Groep 2</u>	<u>Groep 3</u>	<u>Groep 4</u>
1 week	-	-	-	-
2 weken	8	7	10	-
3 weken	12	14	13	-
4 weken	6	8	4	-
5 weken	-	6	-	-
6 weken	3	-	-	-

TABEL 1B

Het aantal E.maxima-oöcysten (2-log) per gram strooisel per week per proefgroep. De infectie heeft plaats gevonden op een leeftijd van een week.

5	<u>Leeftijd</u>	<u>Aantal oöcysten</u>			
		<u>Groep 1</u>	<u>Groep 2</u>	<u>Groep 3</u>	<u>Groep 4</u>
	1 week	-	-	-	-
	2 weken	4	3	8	-
	3 weken	8	6	12	-
	4 weken	9	2	4	-
	5 weken	3	4	2	-
	6 weken	2	2	-	-

Toelichting op Tabellen 1A en 1B

15 Experiment 1a: In de groepen 2 en 3 werd twee weken na de infectie de maximale hoeveelheid oöcysten in het strooisel aangetroffen. Omdat het aantal oöcysten in het strooisel zeer snel achteruit ging, kon het hoge aantal oöcysten in groep 1 op een leeftijd van drie weken alleen verklaard worden op basis van een tweede generatie. Er is zeker geen aantoonbare relatie met de infectiedosis.

20 Experiment 1b: Met uitzondering van de oöcystenuitscheiding in groep 1, die iets later tot stand komt, zijn de resultaten gelijk aan die van experiment 1a.

In de Tabellen 2A en 2B worden de resultaten van het beoordelen van de laesies van de experimenten 1a en 1b weergegeven.

TABEL 2A

- 5 De opgetelde waarden van de laesies na de E.acervulina-infektie, vastgesteld in de dunne darm en beoordeeld op een leeftijd van drie weken bij kuiken 1 t/m 5 en op een leeftijd van vijf weken bij kuiken 6 t/m 10.

		<u>Opgetelde laesies</u>							
		<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
leeftijd in weken		3	5	3	5	3	5	3	5
kuiken	1 en 6	1	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	2 en 7	-	-	1	1	4	-	-	-
kuiken	3 en 8	2	-	2	-	-	1	-	-
kuiken	4 en 9	-	-	-	-	2	-	-	-
kuiken	5 en 10	-	-	3	-	1	-	-	-

20

TABEL 2B

De opgetelde waarden van de laesies na de E.maxima-infektie, vastgesteld in de dunne darm en beoordeeld op een leeftijd van drie weken bij kuiken 1 t/m 5 en op een leeftijd van vijf weken bij kuiken 6 t/m 10.

		<u>Opgetelde laesies</u>							
		<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
leeftijd in weken		3	5	3	5	3	5	3	5
kuiken	1 en 6	-	-	-	-	2	-	-	-
kuiken	2 en 7	-	-	1	-	-	1	-	-
kuiken	3 en 8	2	-	-	1	5	-	-	-
kuiken	4 en 9	-	-	1	-	-	-	-	-
kuiken	5 en 10	-	-	-	2	3	-	-	-

Toelichting op Tabel 2A en 2B

Experiment 1a: De laesies worden vrijwel alleen aangetroffen op een leeftijd van drie weken dus twee weken na de infektie. Er is zeker geen sprake van ernstige afwijkingen.

40

Experiment 1b: De bevindingen zijn vergelijkbaar met die van experiment 1a.

In de Tabellen 3A en 3B worden de resultaten van het microscopisch darmonderzoek bij de geseceerde kuikens uit experiment 1a en 1b weergegeven.

5

TABEL 3A

De aanwezigheid(+) van E.acervulina-oöcysten bij het microscopisch onderzoek van de darmen in experiment 1a, beoordeeld op een leeftijd van drie weken bij kuiken 1 t/m 5 en op een leeftijd van vijf weken bij kuiken 6 t/m 10.

10

		<u>Aanwezigheid oöcysten</u>							
		<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
leeftijd in weken		3	5	3	5	3	5	3	5
kuiken	1 en 6	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	2 en 7	-	-	+	-	+	-	-	-
kuiken	3 en 8	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	4 en 9	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	5 en 10	-	-	-	-	-	-	-	-

TABEL 3B

De aanwezigheid(+) van E.maxima-oöcysten bij het microscopisch onderzoek van de darmen in experiment 1b, beoordeeld op een leeftijd van twee weken bij kuiken 1 t/m 5 en op een leeftijd van vijf weken bij kuiken 6 t/m 10.

		<u>Aanwezige oöcysten</u>							
		<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
leeftijd in weken		3	5	3	5	3	5	3	5
kuiken	1 en 6	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	2 en 7	-	-	-	-	+	-	-	-
kuiken	3 en 8	-	-	-	-	+	+	-	-
kuiken	4 en 9	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	5 en 10	-	-	-	-	-	-	-	-

Toelichting op Tabel 3A en 3B

Experiment 1a en 1b: Het aantal kuikens waarbij oöcysten aangetroffen zijn is klein.

In de Tabellen 4A en 4B worden de gemiddelde gewichten en de standaarddeviatie weergegeven. In experiment 1a zijn de dieren dus besmet op een leeftijd van één week met E.acervulina-oöcysten en in experiment 1b met E.maxima-oöcysten. Het resultaat van de statistische verwerking van de gewichten wordt aangegeven door de letters a en b. Deze letters dienen per week vergeleken te worden. Als de letters gelijk zijn wijst dit niet op een verschil, als ze verschillend zijn echter wel.

TABEL 4A

10 Per week wordt weergegeven: het aantal kuikens per groep (n), het gemiddelde gewicht (gew), de standaarddeviatie (*sd) en het al of niet verschillend zijn van de gewichten (s).

leeftijd in weken	<u>Gewichten</u>							
	<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
	n	gew*sd s	n	gew*sd s	n	gew*sd s	n	gew*sd s
1	20	209	20	209	20	209	20	209
2	20	376*12 b	19	382*14 b	20	371*15 b	20	402*11 a
3	20	591*17 b	19	598*19 b	20	584*15 b	20	635*14 a
4	20	987*22 a	19	973*26 a	19	979*26 a	20	991*23 a
5	20	1403*21 b	19	1385*25 b	19	1410*26 a	20	1421*22 a
6	20	1808*27 a	19	1795*20 b	19	1801*23 a	19	1815*19 a

TABEL 4B

Per week wordt weergegeven: het aantal kuikens per groep (n), het gemiddeld gewicht (gew), de standaarddeviatie (*sd) en het al of niet verschillend zijn van de gewichten.

30

leeftijd in weken	<u>Gewichten</u>							
	<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
	n	gew*sd s	n	gew*sd s	n	gew*sd s	n	gew*sd s
1	20	195	20	195	20	195	20	195
2	20	348*16 b	20	352*17 a	20	327*19 b	20	361*13 a
3	19	562*20 b	20	551*19 b	19	523*17 b	20	592*19 a
4	19	913*31 a	20	906*35 a	19	886*35 b	20	927*30 a
5	19	1327*39 a	20	1335*35 a	18	1268*37 b	19	1343*32 a
6	19	1735*42 a	20	1761*36 a	18	1695*43 b	19	1751*34 a

Toelichting op Tabellen 4A en 4B

Experiment 1a. Op een leeftijd van twee weken, dus een week na de infectie met E.acervulina-oöcysten, bleven de gemiddelde gewichten van de proefdieren achter bij dat van de kontroledieren. Op een leeftijd van 5 zes weken vertoonden de gewichten van de groepen 1 en 3 geen verschil met de controle, groep 2 nog in geringe mate.

Experiment 1b. Op een leeftijd van twee weken, een week na de infectie met E.maxima-oöcysten, bleven de gewichten van de groepen 1 en 3 achter bij dat van de controle. Op zes weken waren de gewichten van de 10 proefgroepen 1 en 2 gelijk aan de controle, groep 3 bleef duidelijk achter in gewicht. Dat de eindgewichten van experiment 1a en 1b nogal verschillend waren lag aan de bijkomende proefomstandigheden, die per experiment wel gelijk waren, maar bij achtereenvolgende experimenten konden verschillen. Dit was bijv. het geval met de buitentemperatuur.

15

De kuikens werden dagelijks geobserveerd. Er werden geen klinische ziekteverschijnselen waargenomen. Alle bloedonderzoeken verliepen negatief ten aanzien van Mg, NCD, IB en IBD. De beide experimenten werden dus niet door deze aandoeningen gekompliseerd.

20

Nabeschouwing

In de bovenbeschreven experimenten zijn een week oude slachtkuikens die op strooisel zijn gehouden geïnfecteerd met verschillende aantallen oöcysten van de typen E.acervulina en E.maxima. Deze infectie resulteert 25 in een oöcystenuitscheiding die in geval de E.acervulina-infectie het hoogste is twee weken en in geval de E.maxima-infectie twee tot drie weken na de infectie. Hierna daalt het aantal oöcysten snel. Er wordt in beide experimenten een gering aantal laesies vastgesteld op een leeftijd van drie weken. Tevens worden bij enkele dieren oöcysten in de dunne 30 darm aangetroffen. Op een leeftijd van vijf weken worden deze bevindingen nauwelijks meer vastgesteld. Uit de gewichtsontwikkeling blijkt dat de infectie reeds na een week een geringe groeiachterstand bewerkstelligt, die in beide experimenten in vrijwel alle groepen op een leeftijd van zes weken gekompenseerd is, waardoor de dieren in 4 van de 6 proef- 35 groepen weer gelijk aan gewicht zijn aan de kontrolegroepen. Al deze kenmerken wijzen op het doormaken van subklinische coccidiosis die, wanneer de infectie ongekompliseerd zijn gang kan gaan, vrijwel zonder schade verloopt.

VOORBEELD II

Het planmatig infekteren en het herinfekteren van slachtkuikens met *Eimeria acervulina* en *Eimeria maxima* in kooien met strooisel.

5 (Experiment 2).

Inleiding

Door Aanvraagster is vastgesteld dat, indien subklinische coccidio-
sis bij slachtkuikens vroegtijdig verloopt, de schade op het einde van
10 de opfokperiode geheel of vrijwel geheel achterwege blijft. Voorts is
vastgesteld dat de door Aanvraagster geïsoleerde *Eimeria* (E.) *acer-*
vulinastam EA-LA en de *E.maximastam* EM-WB zich bij slachtkuikens weinig
virulent gedragen en resistent zijn tegen monensin-natriumzout. In dit
voorbeeld wordt een onderzoek beschreven, waarbij slachtkuikens op een
15 leeftijd van een week planmatig besmet worden met 50 *E.acervulina*- en 50
E.maxima-oöcysten en vervolgens op een leeftijd van vier weken aan een
zware besmetting worden onderworpen. Het onderzoek wordt uitgevoerd in
kooien waarin de kuikens op strooisel worden gehouden, terwijl hen een
voeder met monensin-natrium wordt verstrekt.

20 Het doel van het onderzoek is na te gaan of:

- 1) de *E.acervulinastam* en de *E.maximastam* toegepast in combinatie met
elkaar zich even snel ontwikkelen als beide stammen afzonderlijk;
- 2) de beide stammen een immunogeen effect ontplooiën;
- 3) de toegepaste hoeveelheid oöcysten, 50 van ieder type, voldoende is
25 om het proces te bewerkstelligen.

Proefopzet, monsternamen en methoden.Proefopzet

30 In het experiment werden vier groepen slachtkuikens (ras Arbor
Acres) van telkens 30 henkuikens in kooien op strooisel geplaatst.
Iedere kooi was omhuld door een zak van kunststofmateriaal waarin gefil-
treerde lucht werd geblazen. Het bodemoppervlak per kooi bedroeg ca 1
m². De kuikens werden op fijne houtkrullen gehouden. In iedere kooi was
35 een verwarmingslamp aanwezig. Via een klep aan een korte kant kon men in
de kooi werkzaamheden verrichten. De kuikens werden gevoerd met een
kommercieel slachtkuikenvoer waaraan tot een leeftijd van vier weken 100
ppm monensin-natrium was toegevoegd.

Op een leeftijd van 7 dagen werden de dieren uit de proefgroepen 1
40 en 2 per os geïnfecteerd met 50 gesporuleerde oöcysten *E.acervulina* en

50 gesporuleerde oöcysten E.maxima gesuspendeerd in 1 ml water.

Op een leeftijd van 28 dagen werden de dieren uit de proefgroepen 1 en 3 per os geïnfecteerd met 50.000 gesporuleerde oöcysten E.acervulina en 50.000 gesporuleerde oöcysten E.maxima via het drinkwater. Deze 5 Eimeriae-stammen zijn veldisolaten waarvan niet bekend is of ze resistent zijn tegen anticoccidiosismiddelen. Om deze reden werd vanaf een leeftijd van 4 weken niet langer monensin-natrium via het voeder toegediend.

Groep 4 komt niet in contact met Eimeriae.

10

Monsternamen en onderzoeksmethoden

Iedere week werd een strooiselmonster genomen en werd het aantal oöcysten geteld volgens de methode Long.

Op een leeftijd van 21 en 35 dagen werden telkens vijf kuikens 15 geseceerd, en de laesies beoordeeld volgens de methode van Johnson en Reid, in het voorste, middelste en achterste deel van de dunne darm. Afhankelijk van de ernst van de laesies werden deze gewaardeerd met de punten 0, 1, 2 of 3 per beoordelingsplaats. Er had een microscopisch onderzoek van het voorste, middelste en achterste deel van de dunne darm 20 plaats, teneinde de aanwezigheid van oöcysten vast te stellen. De geseceerde kuikens werden niet gewogen en in de gemiddelde gewichten betrokken.

Wekelijks werden de overige kuikens gewogen. Per week werd met de "Student T"-toets nagegaan of er verschillen tussen de proefgroepen en 25 de niet-geïnfecteerde groep aanwezig waren. Van een verschil werd gesproken als P gelijk of kleiner dan 0,01 is.

Dagelijks werden de dieren geobserveerd en na afloop van de proef op een leeftijd van 42 dagen had een bloedonderzoek plaats ten aanzien van Mg, NCD, IB en IBD.

30

Resultaten

In Tabel 5 wordt het aantal E.acervulina-oöcysten en E.maxima-oöcysten in het strooisel, uitgedrukt in 2-log, weergegeven.

TABEL 5

Het aantal E.acervulina-(ea) en E.maxima-oöcysten(em), 2-log per gram, strooisel per week per proefgroep. De infectie heeft plaatsgevonden op een leeftijd van één week.

<u>Leeftijd</u>	<u>Aantal oöcysten</u>							
	<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
	ea	em	ea	em	ea	em	ea	em
1 week	-	-	-	-	-	-	-	-
2 weken	7	4	6	-	-	-	-	-
3 weken	14	11	10	4	-	-	-	-
4 weken	7	1	12	7	-	-	-	-
5 weken	2	-	8	3	12	8	-	-
6 weken	-	1	1	-	14	4	-	-

Toelichting op Tabel 5

De infectie op een leeftijd van één week resulteerde in een maximale hoeveelheid oöcysten in het strooisel 2 à 3 weken na de infectie (groep 1 en 2). Een herinfectie op een leeftijd van 4 weken had nauwelijks of geen uitscheiding van oöcysten tot gevolg (groep 1), dit in tegenstelling met de infectie van dieren die niet eerder geïnfecteerd zijn (groep 3).

In Tabel 6 worden de resultaten van de beoordelingen van de laesies weergegeven.

TABEL 6

De opgetelde waarderingen van de laesies vastgesteld in de dunne darm, beoordeeld op een leeftijd van drie weken bij kuiken 1 t/m 5 en op een leeftijd van 5 weken bij kuiken 6 t/m 10.

		<u>Opgetelde laesies</u>							
		<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
	<u>leeftijd</u> <u>in weken</u>	3	5	3	5	3	5	3	5
kuiken	1 en 6	1	-	-	-	-	2	-	-
kuiken	2 en 7	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	3 en 8	-	-	3	-	-	4	-	-
kuiken	4 en 9	-	-	-	-	-	1	-	-
kuiken	5 en 10	-	-	-	-	-	3	-	-

Toelichting op Tabel 6

Bij de kuikens, geïnfecteerd op een leeftijd van één week, werden vrijwel geen laesies aangetroffen. Bij de dieren die op een leeftijd van vier weken voor het eerst geïnfecteerd werden, werden wel duidelijke laesies vastgesteld. De dieren, die op een leeftijd van vier weken voor de tweede maal geïnfecteerd werden, vertoonden geen laesies.

In Tabel 7 worden de resultaten van het microscopisch onderzoek van de darmen van de geseceerde kuikens weergegeven. De beoordeling heeft plaats gevonden op een leeftijd van drie weken bij kuiken 1 t/m 5 en op een leeftijd van vijf weken bij kuiken 6 t/m 10.

TABEL 7

		<u>Aanwezige oöcysten</u>							
		<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
leeftijd in weken		3	5	3	5	3	5	3	5
kuiken	1 en 6	-	-	-	-	-	-	-	-
kuiken	2 en 7	-	-	-	-	-	+	-	-
kuiken	3 en 8	-	-	-	+	-	+	-	-
kuiken	4 en 9	-	-	-	-	-	+	-	-
kuiken	5 en 10	+	-	-	-	-	-	-	-

Toelichting op Tabel 7

Bij de op een leeftijd van één week geïnfecteerde dieren zijn vrijwel geen oöcysten aangetroffen. Bij de kuikens die de eerste infectie op een leeftijd van vier weken hadden ondergaan was dit bij drie van de vijf wel het geval. Bij geen der dieren die op een leeftijd van vier weken voor de tweede maal geïnfecteerd werden, resulteerde een oöcysten-respons.

In Tabel 8 worden de gemiddelde gewichten en de standaarddeviatie weergegeven. Het resultaat van de statistische verwerking van de gewichten wordt aangegeven door de letters a en b. Deze letters dienen per week vergeleken te worden. Als de letters gelijk zijn wijst dit niet op een verschil; als ze verschillen echter wel.

TABEL 8

Per week wordt weergegeven: het aantal kuikens per groep (n), het gemiddelde gewicht (gew), de standaard-deviatie (*sd) en het al of niet verschillend zijn van de gewichten.

5

leeftijd in weken	<u>Gewichten</u>							
	<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
	n	gew*sd s	n	gew*sd s	n	gew*sd s	n	gew*sd s
1	20	208	20	208	20	208	20	209
2	20	384*10 b	20	372*12 b	20	392*9 a	19	398*9 a
3	20	598*14 b	20	579*17 b	20	605*13 a	19	614*13 a
4	20	1002*23 a	20	982*28 b	20	1021*22 a	19	1013*18 a
5	20	1427*27 a	20	1397*32 b	20	1413*26 a	19	1424*21 a
6	20	1843*35 a	20	1803*36 b	20	1805*28 b	19	1833*21 a

Toelichting op Tabel 8

De groepen 1 en 2, die op een leeftijd van één week geïnfecteerd werden met E.acervulina- en E.maxima-oöcysten vertoonden een duidelijke groeivertraging in vergelijking met de niet geïnfecteerde dieren. Groep 1 herstelde zich snel, groep 2 bleef gedurende de gehele opfokperiode in gewicht achter. De oorzaak hiervan is niet achterhaald. Een infectie op vier weken had geen enkel effect op de eerder geïnfecteerde dieren (groep 1), maar wel op de nog niet geïnfecteerde dieren (groep 3), die een groeiachterstand opliepen. De tweemaal geïnfecteerde dieren behaalden uiteindelijk hetzelfde gewicht op het einde van de opfokperiode als de niet-geïnfecteerde dieren.

De kuikens werden dagelijks geobserveerd. In groep 3 werd op het einde van de vijfde levensweek diarree vastgesteld, deze was na een viertal dagen weer verdwenen. Andere klinische ziekteverschijnselen werden niet aangetroffen. De bloedonderzoeken verliepen negatief ten aanzien van Mg, NCD, IB, IBD. Het onderzoek werd door deze aandoeningen dus niet gekompliceerd.

Nabeschuwing

In het beschreven experiment is opnieuw vastgesteld, dat een infectie met gesporuleerde oöcysten onmiddellijk aanslaat. Het blijkt, dat dit ook het geval is met een menginfectie. Een lage infectiedosis, t.w.

50 E.acervulina-oöcysten en 50 E.maxima-oöcysten zet het proces op gang. Een herinfektie van deze jong geïnfecteerde kuikens resulteert niet in een oöcystenuitscheiding, laesies in de darmen, oöcystenproduktie in de darmen, een groeiremming of klinische verschijnselen, d.w.z. er treedt
 5 geen herinfektie op. Dit in tegenstelling met een dergelijke infectie bij niet eerder geïnfecteerde dieren waar een massale oöcystenuitscheiding is opgewekt, de groei geremd is en bij de dieren diarree is vastgesteld. Een eenmalige infectie heeft de dieren degelijk beschermd. De gebruikte E.acervulina-stam EA-LA en de gebruikte E.maxima-stam EM-WB
 10 hebben van een immunogene werking blijk gegeven.

Ook nu is vastgesteld dat de aanwezigheid van monensin-natrium in het voer geen aantoonbaar effect heeft op de coccidiosis.

VOORBEELD III

15

Een praktijkonderzoek naar het effect van het planmatig infekteren van slachtkuikens met twee typen Eimeriae om schadelijke veldinfecties te voorkomen. (Experiment 3).

20 Inleiding

In de bovenstaande Voorbeelden I en II is aangetoond, dat het mogelijk is slachtkuikens op een leeftijd van één week te infekteren met zowel Eimeria (E.) acervulina als met E.maxima teneinde een bescherming tegen deze beide typen Eimeriae op te wekken. Indien de E.acervulina-
 25 stam EA-LA en de E.maxima-stam EM-WB voor dit doel aangewend worden, is de methode mogelijk bij aanwezigheid van monensin-natrium in het voeder. Het opwekken van een bescherming vindt derhalve door een infectie plaats, waarbij coccidiosis, weliswaar in een goedaardige vorm, wordt opgewekt. De tot nu toe uitgevoerde voorbeelden I en II werden op kleine
 30 schaal in kooien met een gering aantal dieren uitgevoerd.

In voorbeeld III wordt een onderzoek beschreven van een planmatige infectie en herinfektie onder praktijkomstandigheden. Het doel van het onderzoek is om na te gaan of:

- 1) de infectie van beide typen Eimeriae tegelijkertijd toegediend via
 35 het drinkwater in een suspensie met hulpstoffen direkt aanslaat;
- 2) het praktijkkoppel geen nadeel van de infectie ondervindt;
- 3) het praktijkkoppel beschermd is;
- 4) het coccidiostaticum in het voeder het proces niet in de weg staat.

Proefopzet, monsternamen en methoden

Een experiment werd opgezet op een klein slachtkuikenbedrijf. Dit bedrijf had een stal met een capaciteit van 5000 kuikens. De stal was 10 meter breed en 25 meter lang. De leefruimte was geïsoleerd en had een glad afgewerkte vloer, wanden en zoldering. Een afzuiginstallatie en een hete luchtverwarming waren aanwezig. Door afscheidingen van gaas was de ruimte verdeeld in vier afdelingen van 12,5 x 5 meter. De dieren kregen het voeder verstrekt in voertonnen die met de hand gevuld werden en hadden de beschikking over een automatische drinkwaterinstallatie. Aan de voeders werd het coccidiostaticum monensin-natrium in een concentratie van 100 ppm toegevoegd. Het werd aan de kuikens verstrekt tot een leeftijd van vijf weken. De dieren werden op een leeftijd van 10 dagen gekombineerd geënt door middel van de spraymethode tegen NCD en IB met resp. de Clone 30 en de H120 entstof. Op een leeftijd van drie weken werden de dieren middels het drinkwater geënt tegen IBD met de D78 entstof.

Om de technische resultaten van het experimentele koppel te kunnen beoordelen worden onderstaand de resultaten van de laatste 5 koppels van het bedrijf vermeld, waar nog niet de methode volgens de uitvinding op werd toegepast (wel anti-coccidiosismiddelen)

	Opzet voor het exper. koppel	Voeder-konversie	Daggroei in grammen	Leeftijd	Uitval	Prod. get.
25	5de	2,03	39,6	45	4,8	185
	4de	1,98	39,9	44	5,2	191
	3de	1,95	41,4	43	4,2	203
	2de	1,99	40,2	45	5,3	191
	1ste	1,98	40,3	44	5,6	192

30

Prod.get. = produktiegetal=groei per dier per dag in gram maal overlevingspercentage gedeeld door voederkonversie maal tien.

Methode volgens de uitvinding

Er werden vier groepen kuikens (ras Hybro) opgezet van ieder 1300 stuks. Iedere groep werd op een leeftijd van één week planmatig besmet met Eimeria (E.) acervulina-oöcysten van de stam EA-LA en E.maxima-oöcysten van de stam EM-WB. De besmetting vond plaats via het drinkwater. De gesporuleerde oöcysten waren gesuspenderd in een oplossing van een viscositeitsverhogende stof, een konserverende stof en kleur

stoffen. Deze suspensie bevatte per 100 ml 50.000 gesporuleerde E.acervulina- en 5000 gesporuleerde E.maxima-oöcysten. Van deze suspensie werd 100 ml toegediend aan 1000 kuikens. De suspensie werd zeer goed gemengd met ca 7 liter drinkwater. Voordat de kuikens dit mengsel kregen toegediend hadden zij een uur moeten dorsten.

Op een leeftijd van vier weken zijn de groepen 2 en 4 geïnfecteerd met 50.000 gesporuleerde E.acervulina-oöcysten en 5000 gesporuleerde E.maxima-oöcysten. Deze stammen zijn van dezelfde oorsprong als die gebruikt zijn in Voorbeeld II. Immiddels is vast komen te staan, dat ze geheel of grotendeels resistent zijn ten opzichte van monensin-natrium. Voor de herinfectie zijn de oöcysten zonder meer in het drinkwater gesuspenderd, zoals dit ook in voorbeeld II met succes had plaatsgevonden.

De groepen 1 en 3 fungeerden als controle.

15

Monsternamen en onderzoeksmethoden

Iedere week werd uit iedere groep een strooiselmonster genomen en werd het aantal oöcysten geteld volgens de methode Long.

Op een leeftijd van 3 en 5 weken werden per groep 20 dieren geseceerd en de laesies beoordeeld volgens de methode van Johnson en Reid. De beoordeling vond plaats in het voorste, middelste en achterste deel van de dunne darm. De ernst van de laesies werd gewaardeerd met 0, 1, 2 of 3 punten per beoordelingsplaats. Er had tevens een microscopisch onderzoek van het voorste, middelste en achterste deel van de dunne darm plaats, teneinde de aanwezigheid van oöcysten vast te stellen.

Dagelijks werden de dieren geobserveerd, waarbij speciaal werd gelet op afwijkingen van het maagdarmkanaal en de ademhaling.

Op een leeftijd van 42 dagen werd de proef afgesloten.

30 Resultaten

In Tabel 9 wordt het aantal E.acervulina- en E.maxima-oöcysten in het strooisel uitgedrukt in 2-log weergegeven.

TABEL 9

Het aantal E.acervulina- en E.maxima-oöcysten (2-log) per gram (resp. ea en em) strooisel per week per proefgroep.

5

<u>Leeftijd</u>	<u>Aantal oöcysten</u>							
	<u>Groep 1</u>		<u>Groep 2</u>		<u>Groep 3</u>		<u>Groep 4</u>	
	ea	em	ea	em	ea	em	ea	em
1 week	-	-	-	-	-	-	-	-
2 weken	8	-	7	5	8	-	5	-
3 weken	14	8	13	7	12	11	14	7
4 weken	13	9	10	10	12	7	11	8
5 weken	-	-	6	-	7	5	3	5
6 weken	-	-	-	-	2	-	-	-

Toelichting op Tabel 9

De planmatige infectie heeft geresulteerd in een massale oöcysten-uitscheiding 2 à 3 weken na de infectie. Niet uitgesloten kan worden dat de planmatige infectie gekompliceerd werd door een natuurlijke infectie.

- 20 De zware herinfectie op een leeftijd van 4 weken in de groepen 2 en 4 heeft geen toename in de oöcystenuitscheiding tot gevolg.

- 25 In Tabel 10 worden de resultaten van de "laesienscoring" weergegeven. Dit geschiedt door de scores van de 20 kuikens per groep die op een leeftijd van 3 en 5 weken zijn onderzocht op te tellen en te delen door het aantal onderzochte kuikens.

TABEL 10

- 30 De gemiddelde scores van de laesies per kuiken per groep en per beoordelingstijdstip.

<u>Leeftijd</u>	<u>Gemiddeld aantal laesies per kuiken</u>			
	<u>Groep 1</u>	<u>Groep 2</u>	<u>Groep 3</u>	<u>Groep 4</u>
3 weken	0,21	0,28	0,31	0,23
5 weken	0,08	0,11	0,09	0,04

Toelichting op Tabel 10

- 40 Het aantal aangetroffen laesies twee weken na de infectie is niet erg groot, de afwijkingen zijn regelmatig verdeeld en grote afwijkingen zijn niet vastgesteld. Vier weken na de infectie is het aantal laesies uiterst gering. De zware infectie op een leeftijd van vier weken lijkt

geen invloed te hebben.

In Tabel 11 worden de resultaten van het microscopisch onderzoek van de geseceerde kuikens weergegeven. Dit geschiedt door van de twintig kuikens per onderzoekstijdstip het aantal dieren met E.acervulina-oöcysten en het aantal dieren met E.maxima-oöcysten weer te geven.

TABEL 11

10 Het aantal dieren met E.acervulina- en E.maxima-oöcysten per 20 onderzochte dieren per groep en onderzoekstijdstip.

Leeftijd	Coccidiosis-waarnemingen							
	Groep 1		Groep 2		Groep 3		Groep 4	
	ea	em	ea	em	ea	em	ea	em
3 weken	7	3	12	2	4	4	5	2
5 weken	-	1	-	2	2	-	1	-

20 Toelichting op Tabel 11

Het aantal dieren waarbij twee weken na de infectie oöcysten zijn aangetoond is betrekkelijk groot. In de tabel komt niet tot uitdrukking dat het in het algemeen geringe aantallen oöcysten betreft. De bevindingen op een leeftijd van vijf weken zijn, zoals te verwachten, min-
25 maal. Enige invloed van de zware herinfectie is niet vast te stellen.

In Tabel 12a worden de technische resultaten van de vier groepen kuikens weergegeven. In Tabel 12b worden de resultaten, geïndiceerd tot het produktiegetal, vergeleken met de resultaten van de vijf voorafgaan-
30 de koppels op hetzelfde bedrijf. Ze geven slechts een indicatie over de resultaten van de proefgroepen onderling en de vergelijking met de voorafgaande koppels.

TABEL 12a

De technische resultaten verzameld op een leeftijd van 6 weken van de vier proefgroepen (volgens de uitvinding).

Proefgroep	Voeder-konversie	Daggroei-in grammen	Leeftijd dagen	Uitval in %	Produktie-getal
1	1,97	41,6	42	4,4	202
2	1,96	41,9	42	5,1	203
3	1,95	41,5	42	4,1	204
4	1,96	42,3	42	4,5	206

TABEL 12b

De produktiegetallen van de vier proefgroepen en van de vijf laatste koppels opgezet voor het proefkoppel.

Opzet voor het experimenteel koppel	Produktie-getal	Proef-groep	Produktie-getal
5de	185	1	202
4de	191	2	203
3de	203	3	204
2de	191	4	206
1ste	192	gemiddeld	204

(niet volgens uitvinding)

(volgens uitvinding)

25 Toelichting op Tabellen 12a en 12b

Ondanks dat er geen bewerking van de gegevens heeft plaats gevonden wijzen de gegevens van Tabel 12a en 12b er niet op dat er van enig verschil in technische resultaten tussen de proefgroepen in dit experiment sprake is of dat er een nadelig verschil bestaat met de resultaten van de voorafgaande koppels op het bedrijf. Dit betekent dat zowel de planmatige infectie als de zware herinfectie zeker geen negatief effect hebben gehad. Zo er van een verschil sprake is, is dit ten gunste van het experimentele koppel.

De kuikens werden dagelijks geobserveerd. Verschijnselen van diarree werden gedurende de opfokperiode nooit waargenomen. Op een leeftijd van ruim drie weken werden zeer geringe ademhalingsstoornissen vastgesteld; deze zijn normale reacties op de NCD enting. Andere ziekteverschijnselen zijn achterwege gebleven.

Nabeschouwing

In dit experiment zijn de gegevens uit experiment 2 op praktisch-schaal bevestigd. De gekombineerde infectie van E.acervulina- en E.maxima-oöcysten heeft direkt geresulteerd in een massale oöcystenuitscheiding. Het toedienen van de oöcystensuspensie met toevoegingen middels het drinkwater verliep dus succesvol. De zeer zware herinfectie op een leeftijd van vier weken heeft niet geresulteerd in een oöcystenuitscheiding, laesies, oöcystenbevindingen in de darmen of in slechtere technische resultaten. De op een jonge leeftijd planmatig geïnfecteerde dieren kunnen dus als beschermd beschouwd worden. Het monensin-natrium in het voeder heeft het proces niet beïnvloed. In dit experiment is aangetoond, dat het mogelijk is een planmatige infectie onder praktijkomstandigheden toe te passen om de dieren een zinvolle bescherming te bieden tegen veldinfecties. Uit de literatuur is bekend, dat deze veldinfecties, vooral als ze in de laatste drie levensweken voor het slachten optreden, grote schade veroorzaken.

CONCLUSIES

1. Preparaat, geschikt voor gebruik inzake de preventie van de bij
coccidiosis optredende schade bij pluimvee, g e k e n m e r k t d o o r
5 een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van een of meer Eimeriae-soorten,
welke geheel of grotendeels resistent zijn voor anti-coccidiosis-midde-
len.

2. Preparaat volgens conclusie 1, g e k e n m e r k t d o o r
een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van Eimeria acervulina en/of
10 Eimeria maxima welke geheel of grotendeels resistent zijn voor anti-
coccidiosis-middelen.

3. Preparaat volgens conclusie 2, g e k e n m e r k t d o o r
een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van Eimeria acervulina en Eimeria
maxima, welke geheel of grotendeels resistent zijn voor anti-cocci-
15 diosismiddelen.

4. Voeder resp. drinkwater, geschikt voor pluimvee, g e k e n
m e r k t d o o r een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van
Eimeriae-soorten, welke geheel of grotendeels resistent zijn voor anti-
coccidiosis- middelen.

20 5. Voeder resp. drinkwater volgens conclusie 4, g e k e n m e r k t
d o o r een gehalte aan gesporuleerde oöcysten van Eimeria acervulina
en/of Eimeria maxima, welke geheel of grotendeels resistent zijn voor
anti-coccidiosis-middelen.

6. Voeder resp. drinkwater volgens conclusie 5, g e k e n m e r k t
25 d o o r een gehalte aan oöcysten van Eimeria acervulina en Eimeria
maxima, welke geheel of grotendeels resistent zijn voor anti-coccidio-
sismiddelen.

7. Voeder resp. drinkwater volgens een of meer der conclusies 4-6,
g e k e n m e r k t d o o r een additioneel gehalte aan een of meer
30 anti-coccidiosismiddelen.

8. Werkwijze voor het voorkomen van sub-klinische en klinische
coccidiosismiddelen bij slachtpluimvee die een of meer anti-coccidiosis-
middelen in het voeder verstrekt krijgen, m e t h e t k e n m e r k,
dat men ten minste drie weken voor de slacht het pluimvee met het prepa-
35 raat volgens een of meer der conclusies 1-3 behandelt resp. het voeder
c.q. drinkwater volgens een of meer der conclusies 4-7 toedient.

9. Werkwijze voor het voorkomen van sub-klinische en klinische
coccidiosismiddelen bij opfoklegkuikens die een of meer anti-coccidio-
sismiddelen in het voeder verstrekt krijgen, m e t h e t k e n
40 m e r k, dat men dit pluimvee vóór de leeftijd van 12 weken met het

preparaat volgens een of meer der conclusies 1-3 behandelt resp. het voeder c.q. drinkwater volgens een of meer der conclusies 4-7 toedient.

10. Werkwijze volgens conclusie 8 of 9, met het kenmerk, dat men 10-5000 oöcysten per kuiken toedient.

5 . 11. Werkwijze volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat men 50-500 oöcysten per kuiken toedient.

12. Al dan niet geslacht pluimvee, behandeld volgens de werkwijze zoals beschreven in een of meer der conclusies 8-11.

